

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 676 456

②1 N° d'enregistrement national :

91 05740

⑤1 Int Cl⁸ : C 12 N 9/28, 15/56, 15/75, 15/70, 1/21; D 06 M 16/00;
C 12 S 11/00; C 12 C 11/00; D 21 H 19/54, 17/28/(C 12 N
9/28)(C 12 R 1/10)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 13.05.91.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 20.11.92 Bulletin 92/47.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Declerck Kathalle, Joyet Philippe et
Gallardin Claude.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf
Warcoln Ahner.

⑤4 Variants thermostables de l'alpha-amylase de *Bacillus licheniformis*, leur procédé de préparation et leur utilisation.

⑤7 L'invention concerne un variant thermostable de l'alpha-amylase de *Bacillus licheniformis* caractérisé en ce que, par rapport à la séquence d'acides aminés de la forme naturelle, sa séquence comporte au voisinage de l'histidine (His) en position 133 au moins une substitution par un acide aminé plus hydrophobe que His, et/ou au voisinage de l'Alanine (Ala) en position 209 au moins une substitution par un acide aminé plus hydrophobe que Ala.

Elle concerne également un gène codant pour de tels variants, un vecteur d'expression et la cellule hôte de ce vecteur, ainsi qu'un procédé de préparation de ces variants. Elle concerne enfin l'utilisation de ces variants dans l'industrie.

FR 2 676 456 - A1



L'invention a pour objet de nouvelles alpha-amylases thermostables, leur procédé de préparation ainsi que leur utilisation dans les industries textile, papetière et en brasserie.

5 Sous le terme générique d'amylase, on désigne toute activité enzymatique capable d'hydrolyser tout ou partie des liaisons alpha 1-4 ou alpha 1-6 de l'amidon.

10 Dans la pratique industrielle, on utilise une alpha-amylase dite enzyme liquéfiante, afin d'hydrolyser l'amidon après l'avoir transformé en empois par chauffage à une température supérieure à 95°C. Ce type d'activité enzymatique hydrolyse les liaisons alpha-amylase 1,4 glucosidiques, caractéristiques de l'amylose et du l'amylopectine. L'usage d'une alpha-amylase thermostable présente un intérêt immédiat dans la mesure où il évite d'avoir à refroidir l'empois avant de l'y ajouter. D'autre part, l'opération de liquéfaction ne peut s'effectuer qu'après l'empesage ou
15 gélification de l'amidon natif, après qu'il ait été débarrassé de ses constituants solubles par trempage. La gélification s'effectue à des températures de l'ordre de 100 à 115°C. Il est donc souhaitable de pouvoir disposer d'une amylase qui possède des caractéristiques de thermorésistance accrue, afin notamment de pouvoir effectuer simultanément ou à des
20 température proches les deux opérations d'empesage et de liquéfaction.

En outre, un accroissement de la température réactionnelle permet d'augmenter la cinétique enzymatique et de diminuer la viscosité du mélange.

25 La société danoise Novo commercialise, sous l'appellation Termamyl, une alpha-amylase thermostable produite par fermentation d'une souche de Bacillus licheniformis.

30 Cette enzyme est sécrétée dans le milieu de culture. En l'absence de tout protecteur (ion Ca^{++} et amidon), elle conserve 90 % de son activité après 10 minutes à 80°C. En présence d'ions Ca^{++} 0,1 M, elle est stable à 100 % à 90°C pendant 15 minutes (Rosendal P., Nielsen B.H., Lange NK (1972) Stability of bacterial alpha-amylase in the starch liquefaction process. Die Stärke 31, 368-372).

D'autre part, les publications françaises de brevet FR-A-2 533 583 et FR-A-2 537 602 décrivent le clonage du gène de Bacillus licheniformis codant pour l'alpha-amylase thermostable et son expression par Escherichia coli et Bacillus subtilis, le gène étant localisé sur un plasmide multicopies. Synthétisée par ces deux microorganismes, l'alpha-amylase conserve toutes ses propriétés inchangées : poids moléculaire, thermostabilité, activité spécifique en fonction du pH, propriétés immunologiques. Le gène a été séquencé et sa séquence, ainsi que la séquence d'acides aminés correspondante, sont indiquées à la figure 1.

Les inventeurs ont maintenant mis au point des variants de l'alpha-amylase dont la séquence est représentée à la figure 1, pour lesquels les propriétés intéressantes de l'alpha-amylase de Bacillus licheniformis sont maintenues et qui en outre présentent, par rapport à la forme naturelle, des caractéristiques de thermostabilité accrues.

L'invention a donc tout d'abord pour objet un variant thermostable de l'alpha-amylase de Bacillus licheniformis caractérisé en ce que, par rapport à la séquence d'acides aminés représentée à la figure 1, sa séquence comporte au voisinage de l'histidine (His) en position 133 au moins une substitution par un acide aminé plus hydrophobe que His, et/ou au voisinage de l'Alanine (Ala) en position 209 au moins une substitution par un acide aminé plus hydrophobe que Ala. Le terme "au voisinage de" désigne aussi bien les positions His ou Ala elles-mêmes que quelques acides aminés situés de part et d'autre de ces positions.

La séquence présentée à la figure 1 correspond à la séquence mature de l'alpha-amylase, c'est-à-dire après clivage post-traductionnel du peptide signal.

En ce qui concerne la substitution au voisinage de la position 133, le variant His¹³³ → Tyr¹³³ est tout particulièrement préféré. Il faut également citer les variants pour lesquels His¹³³ est remplacé par un acide aminé choisi parmi Phe, Leu, Tyr, Glu, Lys, Gln.

L'invention repose sur la découverte que la région située notamment autour de l'acide aminé 133 est une région importante, sinon essentielle pour la thermostabilité de la protéine.

Une autre région importante pour la stabilité de l'alpha-amylase se trouve située au voisinage de la position 209 de la protéine mature. En particulier, un ou plusieurs acides aminés naturellement présent en position 209 ou dans son voisinage peut être substitué par un acide aminé choisi
5 notamment parmi Val, Leu, Ile, pour obtenir un variant alpha-amylase thermostable.

Pour cette position, une mutation tout particulièrement préférée est celle pour laquelle Ala²⁰⁹ est substituée par Val²⁰⁹.

Les variants de l'alpha-amylase selon l'invention peuvent
10 contenir une mutation dans une seule des deux régions mentionnées, ou bien dans les deux régions à la fois.

De tels variants doublement mutés possèdent une stabilité accrue à la chaleur par rapport à chacune des amylases variants et une demie vie à 90°C augmentée d'un facteur 9 à 10 par rapport à la forme naturelle.

15 Les variants selon l'invention peuvent être préparés par les techniques de génie génétique, à partir d'un gène de structure modifié par rapport au gène naturel. On utilise à cette fin les techniques courantes de mutagenèse et on prépare un oligonucléotide susceptible de s'hybrider à l'ADNc au voisinage de la position 133.

20 La Demanderesse a également mis au point une stratégie de mutagenèse au hasard, à partir d'un variant thermosensible appelé p841ts (possédant une double mutation en position 164 et 165).

L'invention a donc également pour objet un gène codant pour un variant thermostable de l'alpha-amylase conforme à l'invention. Dans un
25 mode de réalisation préféré, l'invention a pour objet un gène qui comprend la séquence d'ADN telle que représentée à la figure 1, sauf que le codon codant pour His¹³³ est remplacé par un codon codant pour Tyr¹³³ et/ou le codon codant pour Ala²⁰⁹ est remplacé par un codon codant pour Val²⁰⁹.

30 La séquence de la figure 1 n'est pas reprise dans le corps de la description pour ne pas l'alourdir, mais elle en fait partie intégrante.

L'invention a également pour objet un vecteur d'expression d'un variant thermostable de l'alpha-amylase selon l'invention dans une cellule

hôte c'est-à-dire un vecteur qui contient un gène codant pour l'alpha-amylase tel que décrit précédemment ainsi que les éléments assurant son expression dans ladite cellule hôte.

5 Différentes cellules hôtes peuvent être envisagées dans le cadre de l'invention et les éléments assurant l'expression sont choisis en relation avec la cellule hôte. On peut citer plus particulièrement des bactéries, des préférence les bactéries telles que *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* ou *E.coli*.

10 Suivant une caractéristique avantageuse de l'invention, pour l'expression dans *Bacillus subtilis* les éléments assurant l'expression du gène codant pour le variant de l'alpha-amylase contiennent la région régulatrice promoteur-SacR située en amont du gène de la lévane saccharase de *Bacillus subtilis*. Une telle construction est décrite dans la publication de brevet FR-A-2 582 316. Grâce à ce type de construction,
15 l'alpha-amylase est sécrétée dans le milieu extérieur dans des conditions où elle ne l'est pas naturellement, c'est-à-dire durant la phase exponentielle de croissance.

20 Plus généralement, on peut utiliser la région régulatrice du gène codant pour l'alpha-amylase de *Bacillus licheniformis* pour exprimer le gène codant pour le variant selon l'invention dans n'importe quel système hôte.

L'invention a également pour objet les cellules hôtes transformées par un vecteur d'expression selon l'invention ainsi qu'un procédé de préparation des variants conformes à l'invention, selon lequel on cultive des
25 cellules hôtes telles que définies précédemment dans des conditions de culture appropriées et on récupère le variant obtenu.

Enfin, l'invention a pour objet l'utilisation des variants selon l'invention dans différentes industries textile, papetière, en brasserie, notamment pour l'empesage et la liquéfaction de l'amidon.

30 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description détaillée suivante, en relation avec les figures 1 à 6 qui montrent :

- figure 1 : la séquence d'ADN d'un gène de structure de l'alpha-amylase thermostable de *Bacillus licheniformis* ainsi que la séquence d'acides aminés correspondante.
 - figure 2 : la structure du plasmide pINA901.
 - 5 - figure 3 : sous forme d'un courbe, l'évolution comparée de la thermostabilité de l'alpha-amylase His¹³³ et du variant Tyr¹³³ en fonction du temps d'incubation à 90°C en présence de 0,1 mM de CaCl₂.
 - figure 4 : la même courbe que la figure 3 avec 1 mM de CaCl₂.
 - figure 5 : la même courbe que la figure 3 avec 10 mM de
10 CaCl₂.
 - figure 6 : un diagramme représentant la thermostabilité de différents variants en position 133 à des températures variables.
 - figure 7 : diagramme d'inactivation thermique de l'alpha-amylase de *B. licheniformis* par rapport aux variants p84lts et p84lts-
15 Val²⁰⁹, à 90°C, pH6, 1 mM CaCl₂.
 - figure 8 : diagramme d'inactivation thermique de l'alpha-amylase de *B. licheniformis* et des variants d'alpha-amylase à 90°C et pH6, 1 mM CaCl₂.
- Exemple 1 : Préparation du variant Tyr¹³³ de l'alpha-amylase thermostable de *Bacillus licheniformis*.
- 20

1) préparation du gène

On synthétise un oligonucléotide de 25 nucléotides de séquence : 5' TCA GGA GAA TAC CTA ATT AAA GCC CT 3', susceptible de s'hybrider à l'ADN du gène de structure dont la séquence est représentée
25 à la figure 1, et d'y introduire après usage des techniques classiques de mutagénèse dirigée, le codon TAC correspondant à l'acide aminé Tyr à la place du codon CAC correspondant à l'acide aminé His en position 133.

Afin de s'assurer qu'aucune modification autre que la mutation désirée n'est intervenue, on isole un fragment du gène de structure généré
30 par les enzymes de restriction Sst II et Cla I encadrant le codon correspondant à l'acide aminé 133, on détermine sa séquence nucléotidique puis on l'introduit dans un gène naturel traité par les mêmes enzymes Sst II et Cla I, afin de reconstituer un gène entier.

Grâce au gène ainsi reconstitué, il est certain que seule la modification effectuée sur la position 133 est présente et confère à la nouvelle enzyme ses propriétés.

2) Préparation du vecteur d'expression

5 On prépare le plasmide pINA901 dont la structure est représentée à la figure 2. Il s'agit d'un vecteur à faible nombre de copies (10 à 40) possédant plusieurs sites de restriction uniques dans le gène de l'alpha-amylase pour faciliter le sous-clonage des fragments mutés. Ce plasmide pINA901 permet l'expression des gènes d'alpha-amylase à un
10 niveau modéré, non toxique pour les cellules, mais suffisamment élevé pour la caractérisation des variants. Il porte l'origine de réplication (ORI) de type ColEI d'un plasmide à faible nombre de copies dérivé de pJRD158 (Davison et al., 1984). Contrairement à pBR322, le gène de résistance à l'ampicilline (Ap) ne contient pas de site PstI. La délétion d'un fragment
15 XhoI-SalI a permis aussi d'éliminer le site SalI de pJRD158. On introduit un fragment EcoRI-HindIII de 2,9 kb portant le gène codant pour l'alpha-amylase sauvage (Amy). Ainsi construit, ce vecteur possède 8 sites de restriction uniques qui partagent le gène amylase en segments de 120 à 600 kb et facilitent ainsi le sous-clonage de fragments mutés. On remplace
20 ensuite le gène codant pour l'alpha-amylase par le gène préparé précédemment.

3) Expression du gène dans une souche de E.Coli

On transforme une souche de E.Coli avec le plasmide préparé
25 précédemment. Les cellules sont mises en culture en milieu liquide LB (Luria Broth) avec 100 mg/l d'ampicilline, puis elles sont reprises dans 1/2 volume de saccharose 25 % et agitées pendant 15 minutes à 20°C, puis de nouveau 15 minutes à 20°C en présence de saccharose 25 %, EDTA 10 mM. Après centrifugation, les cellules sont reprises dans l'eau glacée et
30 centrifugée après 20 minutes à 0°C.

4) Détermination des caractéristiques du variant obtenu.

La thermostabilité se définit comme étant l'activité amylolytique résiduelle après chauffage.

5 L'activité amylolytique est mesurée par l'action dextrinifiante de l'enzyme. On utilise la méthode à l'iode en mesurant la densité optique à 620 nm d'une solution d'amidon à 1 % (pH = 5.8), en présence d'une solution iodo-iodurée. Les unités sont exprimées en DO par rapport à un témoin sans incubation.

10 Un aliquot de surnageant de culture est soumis à l'action de la température pendant un temps donné et on mesure l'activité enzymatique résiduelle.

L'activité amylolytique résiduelle est exprimée en pourcentage de l'activité par rapport à l'activité d'un aliquot non traité.

15 La détermination de la demi-vie de la protéine obtenue est effectuée à 90°C, dans un tampon acétate de sodium 50 mM, pH 6. Elle dépend de la concentration en Ca^{++} dans le milieu. L'ion Ca^{++} n'intervient pas dans la réaction catalytique mais joue un rôle structural pour le maintien d'une structure biologiquement active.

20 Les résultats obtenus pour différentes concentrations d'ions Ca^{++} sont illustrés par les figures 3 à 5 :

- pour une concentration de 0,1 mM CaCl_2 , les demi-vies sont respectivement de 8 et 5 minutes pour le variant Tyr^{133} et la forme naturelle.

25 - pour une concentration de 1 mM CaCl_2 les demi-vies sont respectivement de 200 et 55 minutes.

- pour une concentration de 10 mM CaCl_2 , le variant Tyr^{133} conserve 95 % de son activité après 5 heures à 90°C, contre 50 % pour la forme naturelle.

30 Exemple 2 : Préparation d'autres variants en position 133.

On procède comme indiqué à l'exemple 1, sauf que la mutagénèse est effectuée de façon à remplacer le codon codant pour His^{133} par un codon codant respectivement pour Ala(A), Glu(E), Pro(P), Lys(K), Leu(L), Ser(S), Gln(Q), Gly(G), Phe(F).

La figure 6 indique les résultats de thermostabilité (activité résiduelle après chauffage) obtenus pour ces différents variants. Elle permet en outre de constater une relation entre le degré d'hydrophobicité de l'acide aminé substitué et la thermostabilité du variant de l'alpha-amylase obtenu. Il apparaît que les variants comportant à la position 133 une substitution par un acide aminé plus hydrophobe que His présentent effectivement une thermostabilité accrue par rapport à la forme naturelle.

Les variants Pro, Ser, Gly, Ala sont donc indiqués uniquement à titre d'exemples comparatifs.

10 Exemple 3 : Obtention d'un gène muté de l'alpha-amylase de Bacillus licheniformis exprimant une protéine plus thermostable que la protéine sauvage.

La nature même de l'enzyme rend difficile l'obtention de variants affectés dans la thermostabilité, en effet une activité amylolytique thermostable ne confère pas un avantage sélectif aux bactéries qui l'expriment, ce qui rend difficile l'usage de cribles génétiques simples, ou l'utilisation de cribles biologiques, comme il en a été décrit pour l'obtention de variants thermostables de la Kanamicine Nucléotidyl-transférase (J. Biol. Chem., 1985, 260, 15298-15303), par l'utilisation de souches bactériennes thermophiles.

Une stratégie de mutagenèse au hasard à partir d'une forme thermosensible de la protéine a donc été développée, afin d'isoler des mutations intragéniques capables de restaurer tout ou partie de la thermostabilité de la forme sauvage.

25 Un tel variant thermosensible a été obtenu par mutagenèse dirigée, il s'agit de la double substitution Asp 164→Ala et Trp 165→Gly. La cinétique de dénaturation thermique à 90°C de ce variant thermosensible, appelé p841ts, est montrée dans la figure 7. A 90°C en présence de tampon acétate 50 mM contenant CaCl₂ 1 mM, plus de 90% de l'activité amylolytique est perdue après 8 minutes d'incubation alors que la protéine sauvage en conserve près de 100 %.

Il fallait choisir un système biologique peu sensible à la chaleur et de manipulation aisée pour la mutagenèse, le séquençage des mutants et la production d'amylase. Le système du phage simple brin M13 remplit toutes ces conditions: après un chauffage de 45 minutes à 80°C la quasi
5 totalité des particules phagiques reste infectieuse; le gène de l'alpha-amylase s'y exprime dans les deux orientations à partir de son propre promoteur ; l'activité amylolytique est facilement repérable sur milieu amidon par la production de halos autour des plages, après coloration à l'iode; les facilités de manipulation tant pour la séquence nucléotidique que
10 pour la mutagenèse sont évidentes.

La totalité du gène de structure, codant pour le variant thermosensible de l'alpha-amylase p841ts, ainsi que la région promotrice, est cloné, sous forme d'un fragment EcoRI-HindIII de 2,8 Kb dans le phage M13mp18. Le phage recombinant obtenu est appelé M 13 mp18 p841ts. La
15 transcription du gène cloné est sous le contrôle de son propre promoteur.

Les particules phagiques sont mutagenisées à l'hydroxylamine (250 mM, tampon acétate pH6) et utilisées pour infecter E. coli TG1. Les cellules sont étalées sur milieu Luria broth, EDTA 1 mM et incubées une nuit à 37°C. Des aliquotes correspondants à 1-10% de particules phagiques
20 survivantes sont utilisés pour l'expérience. Pour augmenter la sensibilité du test, de l'EDTA 1mM est ajouté au milieu afin de chélater les ions Calcium stabilisateurs de l'amylase. Les boîtes sont ensuite placées à haute température (80°C pendant 45 mn) et recouvertes d'une seconde couche de milieu LB gélosé, EDTA 1mM, contenant 1 % d'amidon soluble. Après 45
25 minutes d'incubation à 50°C, les boîtes sont colorées par des vapeurs d'iode. Les phages produisant des amylases thermorésistantes sont détectées par l'apparition d'un halo ; dans ces conditions, l'amylase thermosensible ne produit pas de halo.

Parmi 10^4 phages testés, on a pu isoler un phage produisant une
30 amylase de thermostabilité nettement supérieure à la forme thermosensible.

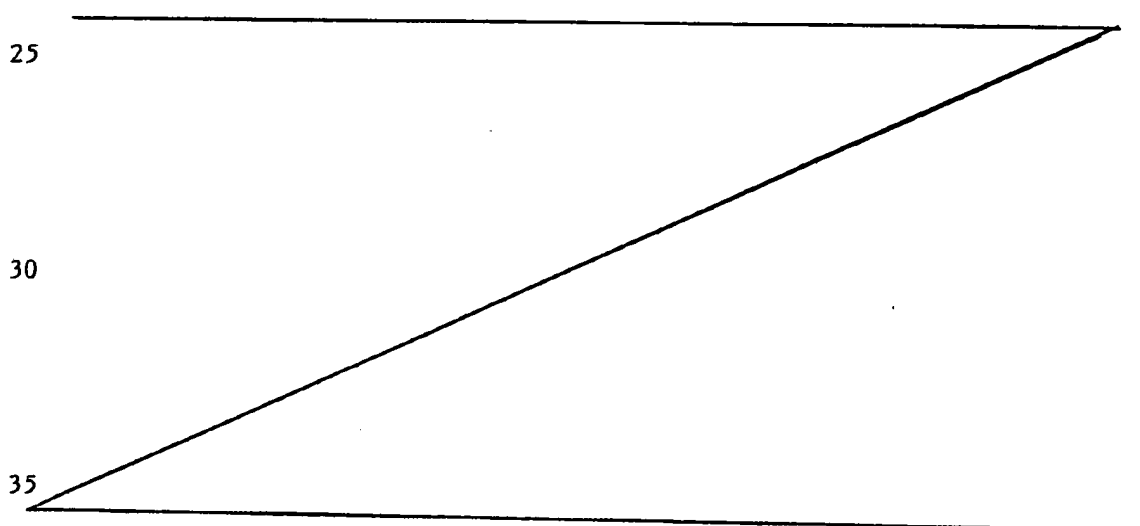
Le séquençage des gènes a révélé une mutation suppressive située en dehors du site de mutation d'origine. La substitution Ala209→Val a été trouvée chez 3 variants indépendants, il est donc probable que seul un petit nombre de positions est susceptible de produire des variants de thermostabilité accrue.

Introduite dans la protéine sauvage, la substitution Ala209→Val augmente par un facteur deux la demie vie de la protéine à 90°C, ce qui constitue un gain appréciable pour cette protéine déjà extrêmement thermostable.

Cette même stratégie appliquée sur le gène cloné dans l'autre orientation dans le phage M13mpl9, ainsi que l'utilisation d'un autre mutagène devrait permettre l'isolement d'autres mutations suppressives, de même que l'utilisation d'un autre variant thermosensible.

Exemple 4

Par recombinaison in vitro, des gènes codant pour les protéines variantes Val²⁰⁹ et Tyr¹³³, on a obtenu le variant protéique doublement substitué Val²⁰⁹-Tyr¹³³. Les effets de ces deux substitutions sur la thermostabilité de la protéine s'additionnent, la demie vie de l'amylase Val²⁰⁹-Tyr¹³³, testée à 90°C en présence de tampon acétate 50 mM et de CaCl₂ 1mM, est de plus de 10 Heures, alors que celles de la protéine sauvage, et de chacun des variants Val²⁰⁹ et Tyr¹³³ sont respectivement de 1h 30, 3h 30 et 4 heures (figure n° 8).



REVENDECATIONS

1. Variant thermostable de l'alpha-amylase de Bacillus licheniformis caractérisé en ce que, par rapport à la séquence d'acides aminés représentée à la figure 1, sa séquence comporte au voisinage de l'histidine (His) en position 133 au moins une substitution par un acide aminé plus hydrophobe que His, et/ou au voisinage de l'Alanine (Ala) en position 209 au moins une substitution par un acide aminé plus hydrophobe que Ala.
2. Variant selon la revendication 1, caractérisé en ce que la substitution au voisinage de la position 133 est effectuée par des acides aminés choisis parmi Phe, Leu, Tyr, Glu, Lys, Gln.
3. Variant de l'alpha-amylase de Bacillus licheniformis
His¹³³ → Tyr¹³³.
4. Variant selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la substitution au voisinage de la position 209 est effectuée par des acides aminés choisis parmi Val, Leu, Ile.
5. Variant de l'alpha-amylase selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'Alanine en position 209 est substituée par une Valine en position 209.
6. Gène codant pour un variant selon l'une des revendications 1 à 5.
7. Gène codant pour un variant selon l'une des revendications 1 à 5, contenant la séquence d'ADN telle que représentée à la figure 1, sauf que le codon codant pour His¹³³ est remplacé par un codon codant pour Tyr¹³³ et/ou le codon codant pour Ala²⁰⁹ est remplacé par un codon codant pour Val²⁰⁹.
8. Vecteur d'expression d'un variant selon l'une des revendications 1 à 3, dans une cellule hôte, caractérisé en ce qu'il contient un gène selon la revendication 6 ou 7, ainsi que les éléments assurant son expression dans ladite cellule hôte.
9. Vecteur d'expression selon la revendication 8, caractérisé en ce que les éléments assurant l'expression comprennent la région régulatrice du gène codant pour l'alpha-amylase de Bacillus licheniformis.

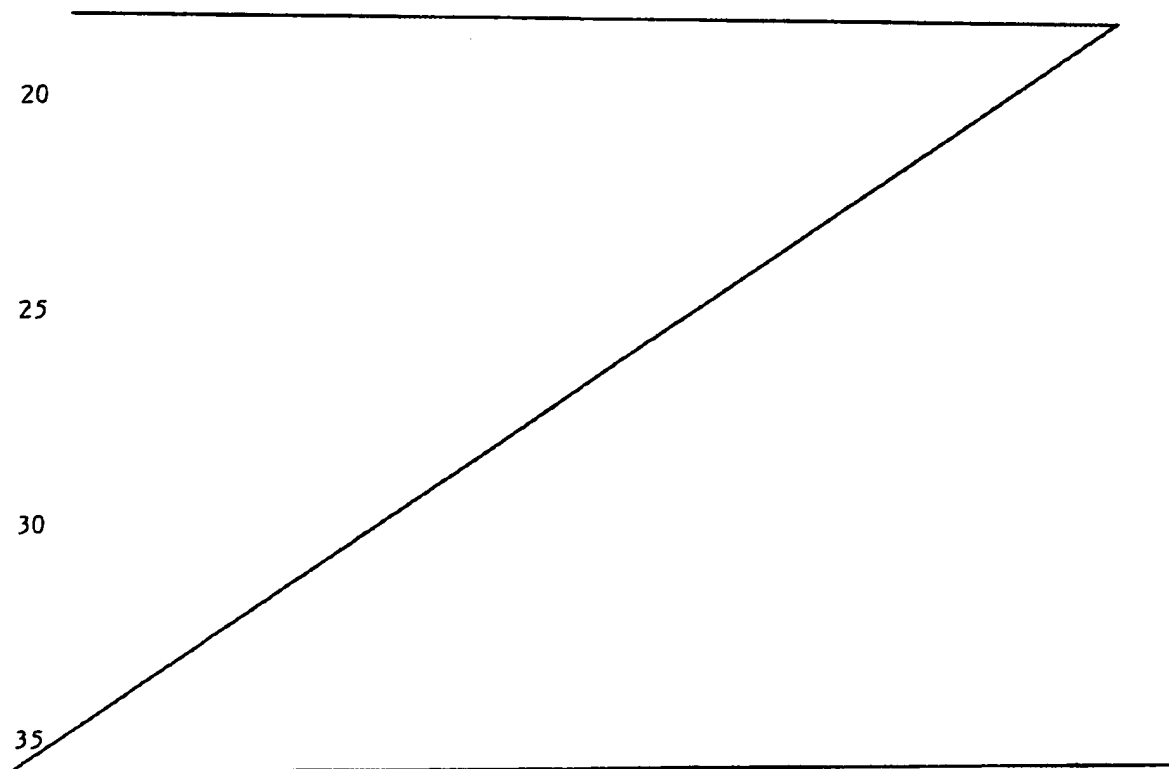
10. Vecteur d'expression selon la revendication 8, caractérisé en ce que les éléments assurant l'expression comprennent la région régulatrice promoteur SacR localisée en amont du gène codant pour la lévane saccharase de *Bacillus subtilis*.

5 11. Cellule hôte transformée par un vecteur d'expression selon l'une des revendications 8 à 10.

12. Cellule hôte selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* et *E.coli*.

10 13. Procédé de préparation des variants selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'on cultive les cellules hôtes selon l'une des revendications 11 ou 12, dans des conditions de culture appropriées et on récupère le variant obtenu.

15 14. Utilisation des variants selon l'une des revendications 1 à 5, dans l'industrie textile, papetière, en brasserie, notamment pour l'empesage et la liquéfaction de l'amidon.



1 / 9

ala asn leu asn gly thr leu met gln tyr phe
 1 GCA AAT CTT AAT GGG ACG CTG ATG CAG TAT TTT

 glu trp tyr met pro asn asp gly gln
 GAA TGG TAC ATG CCC AAT GAC GGC CAA

 his trp lys arg leu gln asn asp ser ala tyr
 61 CAT TGG AAG CGT TTG CAA AAC GAC TCG GCA TAT

 leu ala glu his gly ile thr ala val
 TTG GCT GAA CAC GGT ATT ACT GCC GTC

 trp ile pro pro ala tyr lys gly thr ser gln
 121 TGG ATT CCC CCG GCA TAT AAG GGA ACG AGC CAA

 ala asp val gly tyr gly ala tyr asp
 GCG GAT GTG GGC TAC GGT GCT TAC GAC

 leu tyr asp leu gly glu phe his gln lys gly
 181 CTT TAT GAT TTA GGG GAG TTT CAT CAA AAA GGG

 thr val arg thr lys tyr gly thr lys
 ACG GTT CGG ACA AAG TAC GGC ACA AAA

 gly glu leu gln ser ala ile lys ser leu his
 241 GGA GAG CTG CAA TCT GCG ATC AAA AGT CTT CAT

 ser arg asp ile asn val tyr gly asp
 TCC CGC GAC ATT AAC GTT TAC GGG GAT

 val val ile asn his lys gly gly ala asp ala
 301 GTG GTC ATC AAC CAC AAA GGC GGC GCT GAT GCG

 thr glu asp val thr ala val glu val
 ACC GAA GAT GTA ACC GCG GTT GAA GTC
~~SAT~~
 asp pro ala asp arg asn arg val ile
 361 GAT CCC GCT GAC CGC AAC CGC GTA ATT

 ser gly glu his leu ile lys ala trp thr his
 TCA GGA GAA CAC CTA ATT AAA GCC TGG ACA CAT

FIG.1...

2 / 9

```

      phe his phe pro gly arg gly ser thr tyr ser
421 TTT CAT TTT CCG GGG CGC GGC AGC ACA TAC AGC

      asp phe lys trp his trp tyr his phe
      GAT TTT AAA TGG CAT TGG TAC CAT TTT

      asp gly thr asp trp asp glu ser arg lys leu
481 GAC GGA ACC GAT TGG GAC GAG TCC CGA AAG CTG

      asn arg ile tyr lys phe gln gly lys
      AAC CGC ATC TAT AAG TTT CAA GGA AAG

      ala trp asp trp glu val ser asn glu asn gly
541 GCT TGG GAT TGG GAA GTT TCC AAT GAA AAC GGC

      asn tyr asp tyr leu met tyr ala asp
      AAC TAT GAT TAT TTG ATG TAT GCC GAC

      ile asp tyr asp his pro asp val ala ala glu
601 ATC GAT TAT GAC CAT CCT GAT GTC GCA GCA GAA
      Clat
      ile lys arg trp gly thr trp tyr ala
      ATT AAG AGA TGG GGC ACT TGG TAT GCC

      asn glu leu gln leu asp gly phe arg leu asp
661 AAT GAA CTG CAA TTG GAC GGT TTC CGT CTT GAT

      ala val lys his ile lys phe ser phe
      GCT GTC AAA CAC ATT AAA TTT TCT TTT

      leu arg asp trp val asn his val arg glu lys
721 TTG CGG GAT TGG GTT AAT CAT GTC AGG GAA AAA

      thr gly lys glu met phe thr val ala
      ACG GGG AAG GAA ATG TTT ACG GTA GCT

      glu tyr trp gln asn asp leu gly ala leu glu
781 GAA TAT TGG CAG AAT GAC TTG GGC GCG CTG GAA

      asn tyr l u asn lys thr asn phe asn
      AAC TAT TTG AAC AAA ACA AAT TTT AAT

```

FIG.1...

3 / 9

```

      his ser val phe asp val pro leu his tyr gln
841 CAT TCA GTG TTT GAC GTG CCG CTT CAT TAT CAG

      phe his ala ala ser thr gln gly gly
      TTC CAT GCT GCA TCG ACA CAG GGA GGC

      gly tyr asp met arg lys leu leu asn gly thr
901 GGC TAT GAT ATG AGG AAA TTG CTG AAC GGT ACG

      val val ser lys his pro leu lys ser
      GTC GTT TCC AAG CAT CCG TTG AAA TCG

      val thr phe val asp asn his asp thr gln pro
961 GTT ACA TTT GTC GAT AAC CAT GAT ACA CAG CCG

      gly gln ser leu glu ser thr val gln
      GGG CAA TCG CTT GAG TCG ACT GTC CAA

      thr trp phe lys pro leu ala tyr ala phe ile
1021 ACA TGG TTT AAG CCG CTT GCT TAC GCT TTT ATT

      leu thr arg glu ser gly tyr pro gln
      CTC ACA AGG GAA TCT GGA TAC CCT CAG

      val phe tyr gly asp met tyr gly thr lys gly
1081 GTT TTC TAC GGG GAT ATG TAC GGG ACG AAA GGA

      asp ser gln arg glu ile pro ala leu
      GAC TCC CAG CGC GAA ATT CCT GCC TTG

      lys his lys ile glu pro ile leu lys ala arg
1141 AAA CAC AAA ATT GAA CCG ATC TTA AAA GCG AGA

      lys gln tyr ala tyr gly ala gln his
      AAA CAG TAT GCG TAC GGA GCA CAG CAT

      asp tyr phe asp his his asp ile val gly trp
1201 GAT TAT TTC GAC CAC CAT GAC ATT GTC GGC TGG

      thr arg glu gly asp ser ser val ala
      ACA AGG GAA GGC GAC AGC TCG GTT GCA

```

FIG. 1...

4 / 9

asn ser gly leu ala ala leu ile thr asp gly
1261 AAT TCA GGT TTG GCG GCA TTA ATA ACA GAC GGA

pro gly gly ala lys arg met tyr val
CCC GGT GGG GCA AAG CGA ATG TAT GTC

gly arg gln asn ala gly glu thr trp his asp
1321 GGC CGG CAA AAC GCC GGT GAG ACA TGG CAT GAC

ile thr gly asn arg ser glu pro val
ATT ACC GGA AAC CGT TCG GAC CCG GTT

val ile asn ser glu gly trp gly glu phe his
1381 GTC ATC AAT TCG GAA GGC TGG GGA GAG TTT CAC

val asn gly gly ser val ser ile tyr
GTA AAC GGC GGG TCG GTT TCA ATT TAT

val gln arg
1441 GTT CAA AGA

FIG.1...

FIG. 2

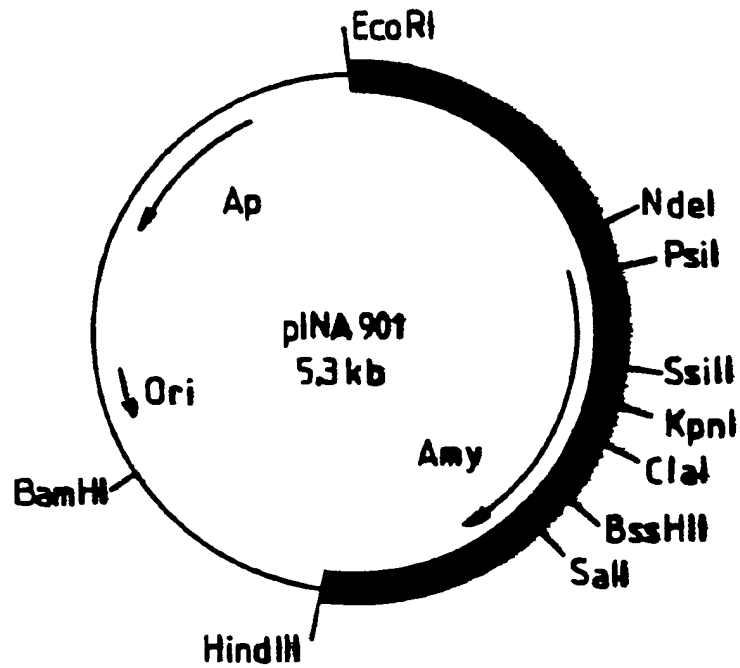


FIG. 3

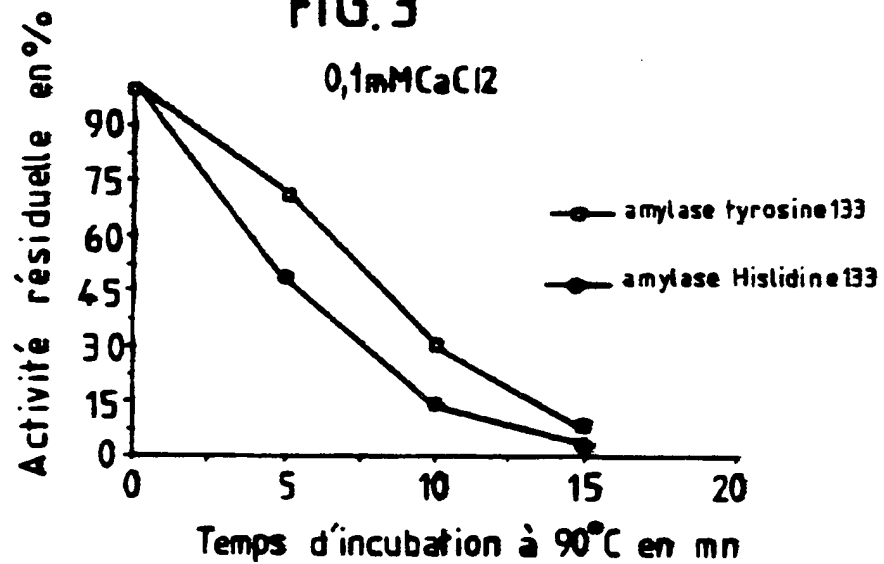


FIG.4

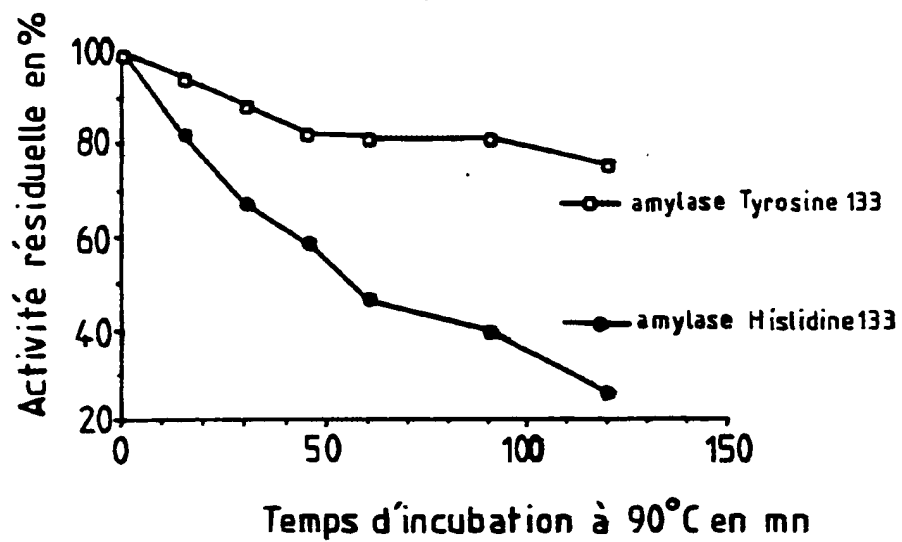
1mM CaCl₂

FIG.5

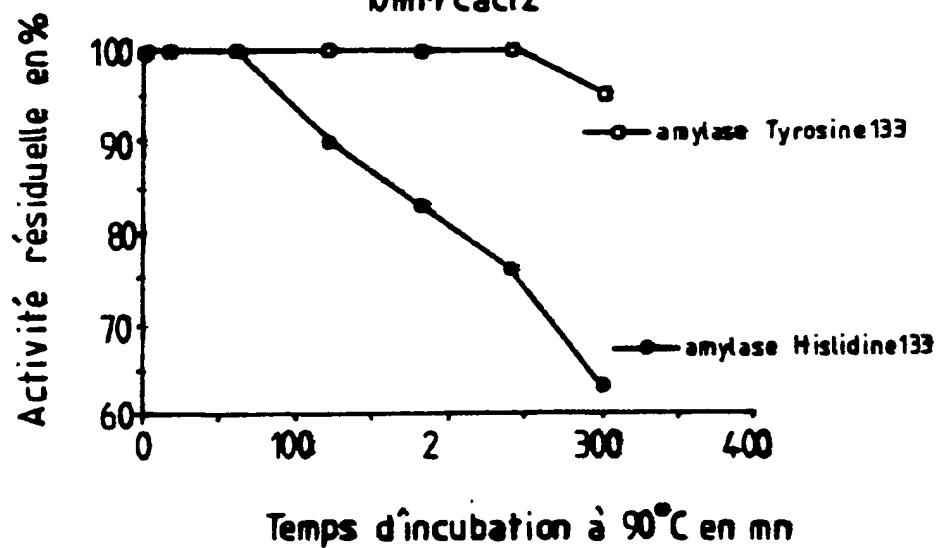
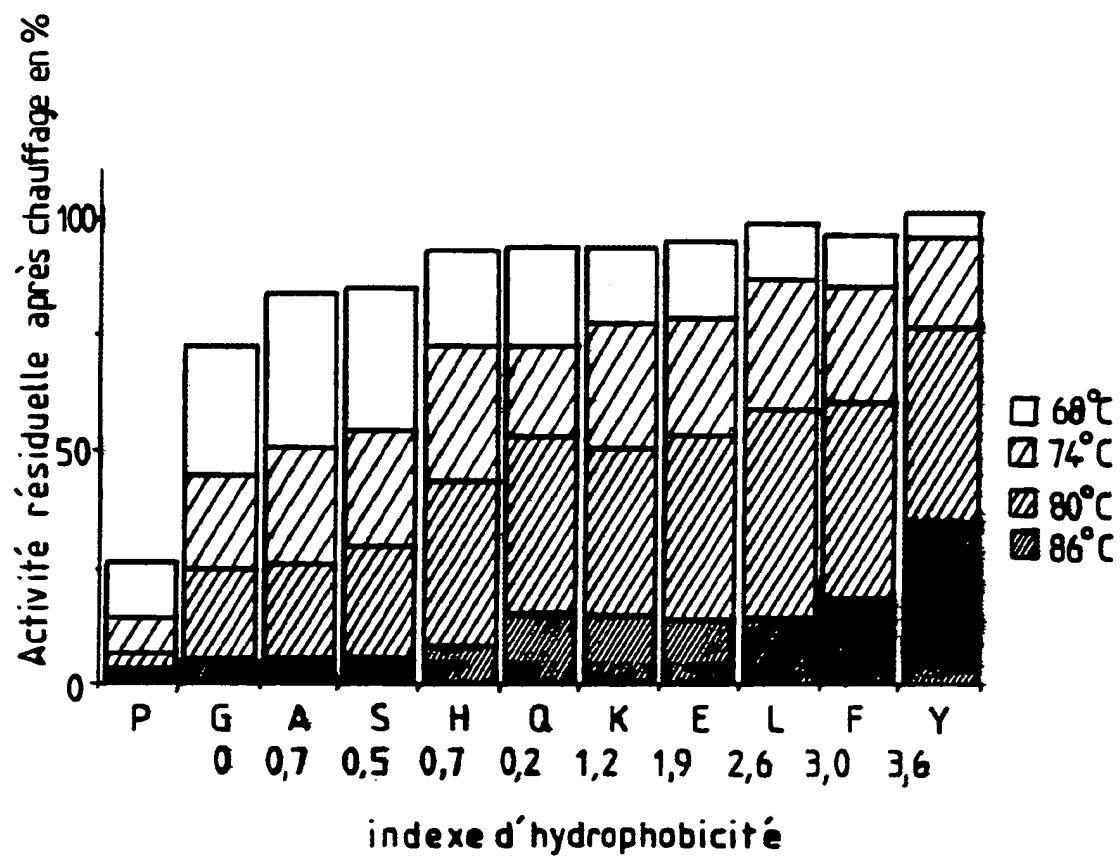
10mM CaCl₂

FIG. 6



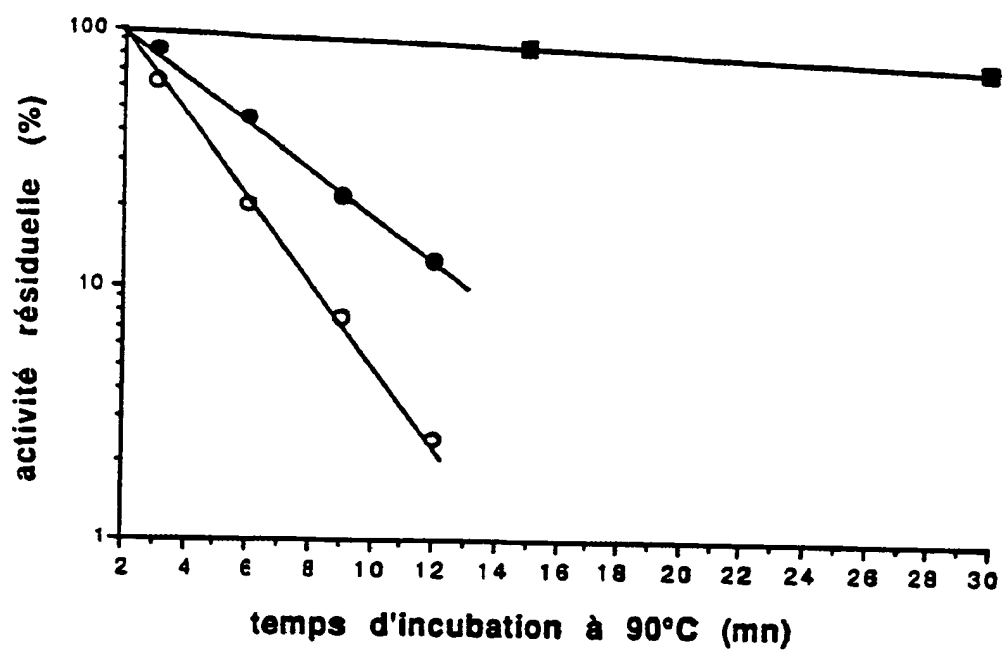
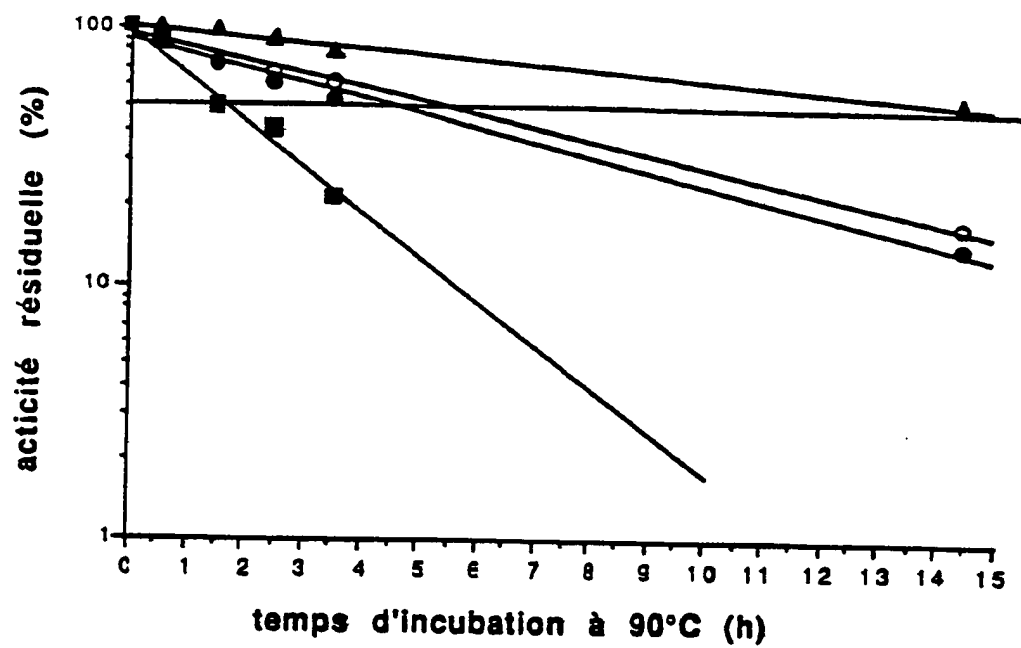


Figure 7



- variant de l'amylase Tyr133
- amylase de type sauvage
- variant de l'amylase Val 209
- ▲ variant de l'amylase Val 209-Tyr 133

Figure 8

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9105740
FA 457311

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 265, no. 26, 15 Septembre 1990, BALTIMORE US pages 15481 - 15488; N. DECLERCK ET AL: 'Use of amber suppressors to investigate the thermostability of Bacillus licheniformis alpha-amylase' * le document en entier *	1-3, 6-13
X	EP-A-0 410 498 (GIST-BROCADES) 30 Janvier 1990 * revendications 7-11, 16-21 *	1-3, 6-14
X	JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 98, 1985, TOKYO JP pages 1147 - 1156; T. YUUKI ET AL: 'Complete nucleotide sequence of a gene coding for heat- and pH-stable alpha-amylase of Bacillus licheniformis; Comparison of the amino acid sequences of three bacterial liquefying alpha-amylases deduced from the DNA sequences.' * figure 5 *	4-13
D, A	FR-A-205 371 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIC) 17 Décembre 1986 * le document en entier *	10
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 32, 15 Novembre 1989, BALTIMORE US pages 18933 - 18938; Y. SUZUKI ET AL: 'Amino acid residues stabilizing a Bacillus alpha-amylase against irreversible thermo-inactivation'	
Date d'achèvement de la recherche 02 DECEMBRE 1991		Examinateur VAN DER SCHAAL C.A.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		